

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan populasi tanaman pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.Vahl) yang diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel pada penelitian ini yaitu daun pecut kuda yang digunakan berwarna hijau, segar, ketinggian tanaman lebih dari 30 cm, serta bebas terhadap penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini merupakan serbuk daun pecut kuda yang diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksan, air, dan etil asetat.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini merupakan penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dari ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.Vahl) sebagai tabir surya.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas merupakan variabel pengaruhnya terhadap variabel terikat yang sengaja direncanakan untuk diteliti. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol 96% daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.Vahl) dalam berbagai seri konsentrasi.

Variabel terikat adalah titik utama dari permasalahan yang menjadi topik dalam penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu nilai *Sun Protection Factor* (SPF), kadar flavonoid total, kadar fenolik total ekstrak dari fraksi daun pecut kuda.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap mempunyai pengaruh sehingga dapat dilakukan pengulangan penelitian lain dengan baik. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, metode fraksinasi, nilai absorbansi pada spektrofotometri, pemilihan alat spektrofotometri, dan peneliti

Pengendalian absorbansi dilakukan dengan preparasi sampel yang tepat dan pengenceran sampel bila diperlukan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pecut kuda diperoleh dari Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah yang berwarna hijau, segar, ketinggian tanaman lebih dari 30 cm, dan bebas dari hama.

Kedua, serbuk daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.Vahl) adalah daun pecut kuda yang segar dicuci untuk menghilangkan kotoran kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C, lalu dihaluskan kemudian dilakukan pengayakan dengan no ayakan 60 untuk menghasilkan serbuk simplisia.

Ketiga, ekstrak etanol 96% adalah hasil dari proses maserasi serbuk simplisia daun pecut kuda menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, fraksi *n*-heksan yaitu hasil fraksinasi ekstrak etanol 96% dengan pelarut *n*-heksan, hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator. Kelima, fraksi etil asetat yaitu hasil fraksinasi ekstrak etanol 96% dengan pelarut etil asetat, hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator.

Keenam, kadar flavonoid total dan fenolik total adalah hasil penentuan flavonoid total dan fenolik total ekstrak dan fraksi daun pecut kuda dengan metode kolorimetri.

Ketujuh, penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) adalah penentuan SPF yang dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400–290 nm dengan interval 1 nm, yang memiliki serapan (*A*) minimal 0,05 untuk ekstrak selanjutnya hasil absorbansi ditentukan nilai SPF menghitung luas area di bawah kurva (AUC).

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.Vahl) diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah. Digunakan bahan aktif yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Bahan yang digunakan untuk fraksinasi yaitu *n*-heksan dan etil asetat. Bahan yang digunakan untuk uji kualitatif yaitu HCl, serbuk magnesium, metanol, FeCl₃, H₂SO₄, pereaksi Dragendorf, pereaksi wagner, pereaksi Mayer, kloroform, amonia, asam asetat glasial, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ 1%. Bahan yang digunakan untuk uji kuantitatif yaitu NaNO₂ 5%, AlCl₃ 10%,

NaOH 1 % (E-Merck), reagen *folin-ciocalteu* (E-Merck). Etanol 96% pro analisis digunakan sebagai blanko pada pengukuran absorbansi.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat – alat kaca laboratorium. Timbangan analitik (OHAUS PINEER PA 214) yang digunakan untuk menimbang sampel. Rotary evaporator atau *water bath* (HEIDOLPH-HEISBAD HB DIGIT) yang digunakan untuk penguapan pelarut. Ayakan no 60 digunakan untuk mengayak serbuk daun pecut kuda. Spektrofotometer UV-Vis (SHIMADZU UV-1800) digunakan untuk mengukur absorbansi ekstrak dan fraksi sampel. Seperangkat alat – alat gelas laboratorium.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun pecut kuda

Determinasi tanaman digunakan untuk mngetahui benar tidaknya suatu sampel daun pecut kuda yang meliputi bentuk morfologis yang terdapat pada tanaman pecut kuda di UPT laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta. Sampel yang digunakan yaitu tanaman pecut kuda yang diperoleh dari Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah berwarna hijau, segar, ketinggian tanaman lebih dari 30 cm, dan terbebas dari penyakit.

2. Pembuatan serbuk daun pecut kuda

Sampel daun pecut kuda yang berwarna hijau, masih segar diambil dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah kemudian disortasi basah untuk menghilangkan pengotor hasil pemanenan, dicuci dengan air yang mengalir. Pengeringan simplisia menggunakan oven pada suhu 40-50°C kemudian dilanjutkan sortasi kering bertujuan untuk menghilangkan benda asing yang terdapat pada sampel selama proses pengeringan. Simplisia hasil pengeringan kemudian ditimbang dan dihaluskan dengan alat penyerbukan sehingga diperoleh serbuk. Serbuk hasil penghalusan diayak dengan ayakan no. 60 sehingga diperoleh serbuk yang ukurannya seragam dan dihitung rendemen dengan persamaan 7.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat produk yang dihasilkan}}{\text{Bahan baku yang digunakan}} \times 100 \% \quad (7)$$

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun pecut kuda

Uji susut pengeringan menggunakan cara LOD (*Lost On Drying*) menggunakan alat *Moisture Analyzer* dengan suhu 105 °C. Cara melakukan uji susut pengeringan yaitu dinyalakan alat kemudian dipasang piring alumunium dan letakan pada alat. Sebanyak 2 gram simplisia kering daun pecut kuda ditimbang pada piring dan diratakan, kemudian ditutup alat dan ditunggu sampai terdengar alarm yang menunjukkan bahwa proses telah selesai (Kemenkes RI, 2017).

4. Pembuatan ekstrak daun pecut kuda

Ekstraksi daun pecut kuda dilakukan dengan maserasi. Simplisia daun pecut kuda ditimbang sebanyak 300 gram. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi maserasi yaitu etanol 96% dengan ratio 1:10. Perendaman dilakukan selama 6 jam pertama sambil sekali di aduk. Proses ekstraksi dilakukan selama 18 jam. Dilakukan remaserasi dengan etanol 96% selama satu hari dengan pelarut setengah dari pelarut awal. Penyimpanan yaitu di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan pada suhu 40-50°C sampai terbentuk ekstrak kental. Dihitung rendemen dengan menggunakan (persamaan 7) (Kemenkes RI, 2017).

5. Pengujian Organoleptis serbuk dan ekstrak daun pecut kuda

Serbuk dan ekstrak daun pecut kuda diamati secara visual kemudian dilakukan pengamatan organoletis meliputi: bentuk, warna, bau, dan rasa. Catat hasil pengamatan.

6. Penetapan kadar air ekstrak daun pecut kuda

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri dengan menimbang kurang lebih sebanyak 10 gram sampel, dimasukkan ke dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, dan ditimbang. Penimbangan dilanjutkan pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut – turut tidak lebih dari 0,25 %. Rumus penetapan kadar air dapat dilihat pada lapiran 2 (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{kadar air \%} = \frac{\text{bobot sampel sebelum} - \text{bobot sampel setelah}}{\text{bobot sampel sebelum dikeringkan}} \times 100\% \quad (8)$$

7. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menimbang 7,5 gram ekstrak etanol 96 % daun pecut kuda dilarutkan dalam etanol 96 % sebanyak 10 ml dan ditambah 65 ml air (1:10) kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Ditambahkan 75 ml *n*-heksan sampai warna *n*-heksan hasil fraksinasi sama dengan warna *n*-heksan murni. Diambil lapisan *n*-heksan kemudian ditampung dan diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* dan *water bath*. Residu hasil fraksinasi *n* – heksan di masukkan corong pisah dan ditambahkan dengan etil asetat sebanyak 75 ml sampai warna etil asetat hasil fraksinasi sama dengan warna etil asetat murni. Diambil bagian etil asetat kemudian ditampung dan diuapkan samapai terbentuk fraksi kental (Sari dkk., 2022).

8. Identifikasi kandungan senyawa daun pecut kuda

8.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Ditimbang sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi daun pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 5 ml etanol. Dipanaskan tabung selama 5 menit kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Larutan ditambahkan dengan serbuk magnesium sebanyak 0,2 gram. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah coklat (Rante dkk., 2020)

8.2 Identifikasi senyawa fenol. Ditimbang sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi dilarutkan dengan 1 ml metanol. Ditetesi dengan FeCl_3 1 %. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru sampai hitam (Depkes RI, 1979).

8.3 Identifikasi senyawa tanin. Ditimbang sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi kemudian ditambahkan dengan air panas sebanyak 10 ml. Ditetesi dengan reagen FeCl_3 . Hasil positif ditunjukkan terbentuknya warna hijau kehitaman (Rante dkk., 2020)

8.4 Identifikasi senyawa alkaloid. Ditimbang sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 10 ml amonia, 2 ml kloroform dan 10 tetes H_2SO_4 hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan H_2SO_4 dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing tabung reaksi ditambahkan dengan pereaksi Dragendorf, Mayer, dan Wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih menggunakan pereaksi Mayer, terbentuknya larutan berwarna coklat menggunakan pereaksi Wagner, dan terbentuknya warna merah jingga menggunakan pereaksi Dragendorf (Rante dkk., 2020).

8.5 Identifikasi senyawa saponin. Ditimbang sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi kemudian ditambah dengan aquadest dikocok selama 1 menit. Diamati buih yang terbentuk selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan timbulnya buih dengan tinggi 1 – 3 cm (Rante dkk., 2020).

8.6 Identifikasi senyawa steroid/triterpenoid. Ditimbang sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi dimasukkan tabung reaksi. Ditambah asam asetat glasial sebanyak 10 tetes dan asam sulfat pekat 2 tetes. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau ungu positif mengandung triterpenoid. Larutan positif steroid dengan terbentuknya warna biru atau hijau (Rante dkk., 2020).

9. Penetapan Kadar Flavonoid Total

9.1 Penentuan Panjang Gelombang maksimum. Baku pembanding kuersetin dibuat larutan dalam konsentrasi 100 ppm. Larutan pembanding sebanyak 0,5 ml, ditambahkan 1,5 ml etanol. Ditambahkan 0,1 ml AlCl_3 10 %, kemudian ditambah CH_3COONa 1 M dan 2,8 ml air. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 800-400 nm menggunakan alat spektrofotometri Uv-Vis.

9.2 Penentuan *Operating Time*. Baku pembanding kuersetin dibuat larutan dalam konsentrasi 100 ppm. Larutan pembanding sebanyak 0,5 ml, ditambahkan 1,5 ml etanol. Ditambahkan 0,1 ml AlCl_3 10 %, kemudian ditambah CH_3COONa 1 M dan 2,8 ml air. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

9.3 Penentuan Kadar flavonoid total. Sampel diambil sebanyak 10 mg dan diencerkan dengan 25 ml methanol. Disaring dan dimasukkan dalam labu ukur 25 ml, ditambahkan metanol sampai tanda batas. Baku pembanding ditimbang sebanyak 10 mg dimasukkan dalam labu ukur 25 ml, kemudian ditambah metanol sampai tanda batas. Pengukuran lamda maksimum menggunakan larutan dengan konsentrasi 100 ppm pada panjang gelombang 800-400 nm, dilanjutkan penetapan operating time menggunakan dengan konsenstrasi 100 ppm. Kurva standar kuersetin dihasilkan dengan mengukur absorbansi berbagai konsentrasi kuersetin diantaranya 40, 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm. Larutan uji dan larutan pembanding sebanyak 0,5 ml, ditambahkan masing-masing 1,5 ml etanol. Ditambahkan 0,1 ml AlCl_3 10 %, kemudian ditambah CH_3COONa 1 M dan 2,8 ml air. Absorbansi dibaca pada lamda

maksimum dengan spektrofotometri UV-Vis. Hasil pengukuran absorbansi kurva baku digunakan untuk menghitung regresi linear. Kadar flavonoid dari sampel ekstrak dan fraksi daun pecut kuda dihitung menggunakan rumus % flavonoid total = $c (V/m)$. QE = kuersetin equivalen; c = konsentrasi flavonoid total berdasarkan kurva standar kuersetin (mg/l); V = volume ekstrak (l); m = berat ekstrak (g) (Kemenkes RI, 2017).

10. Penetapan Kadar Fenolik Total

10.1 Penetapan Panjang Gelombang maksimum. Larutan pembanding asam galat dibuat dalam konsentrasi 40 ppm. larutan pembanding diukur sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 5 ml Folin-Ciocalteu LP (7,5 % dalam air). Ditambahkan NaOH 1%. Dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 800-400 nm menggunakan alat spektrofotometri Uv-Vis.

10.2 Penetapan *Operating time*. Baku pembanding asam galat dibuat larutan dalam konsentrasi 40 ppm. larutan pembanding diukur sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 5 ml Folin-Ciocalteu LP (7,5 % dalam air). Ditambahkan NaOH 1%. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

10.3 Penetapan kadar fenolik total. Penetapan kadar fenol diukur dengan spektrofotometri menggunakan reagen Folin–Ciocalteu. Sebanyak 10 gram sampel ditimbang dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Ditambah dengan metanol sampai batas tanda 25 ml. ditimbang 10 mg pembanding dimasukkan dalam labu ukur 25 ml. Kemudian ditambahkan dengan metanol sampai batas tanda. Pengukuran lamda maksimum menggunakan larutan dengan konsentrasi 40 ppm pada panjang gelombang 800-400 nm, dilanjutkan penetapan operating time menggunakan dengan konsentrasi 40 ppm. Kurva standar standar asam galat dibuat dengan mengukur absorbansi berbagai konsentrasi asam galat yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Masing-masing larutan uji dan larutan pembanding diukur sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 5 ml Folin-Ciocalteu LP (7,5 % dalam air). Ditambahkan NaOH 1%. Diukur pada panjang gelombang maksimum. Larutan standar asam galat digunakan untuk menghitung regresi linear. Kadar fenolik total dari ekstrak dan fraksi daun pecut kuda dihitung menggunakan rumus % fenol total = $c (V/m)$. c = konsentrasi fenol total dari kurva standar asam

galat (mg/l); V = volume ekstrak (l); m = berat ekstrak (g) (Kemenkes RI, 2017).

11. Penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF)

Penentuan aktivitas tabir surya dilakukan dengan menetapkan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penetapan nilai SPF dilakukan pada ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun pecut kuda dengan mengukur nilai absorbansi.

11.1 Penyiapan sampel. Penyiapan sampel dilakukan terhadap ekstrak, fraksi *n* – heksan, dan fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun pecut kuda. Masing masing sampel dilarutkan dalam etanol 96% pro analisis disiapkan dengan konsentrasi 200 ppm untuk dianalisis. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada lamda 400-290 nm pada interval 1 nm menggunakan blanko etanol 96% pro analisis untuk setiap pengukuran.

11.2 Penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF). Hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak dan fraksi dilakukan perhitungan nilai SPF dengan menghitung luas area di bawah kurva serapan (AUC). Spektrum serapan dengan panjang gelombang 400-290 nm dan interval 1 nm diukur dengan spektrofotometer UV-Vis.

$$AUC = \frac{Aa+Ab}{2} \times dPa - b \dots \dots \dots \text{persamaan 5}$$

Keterangan :

Aa : Serapan pada panjang gelombang a nm

Ab : Serapan pada panjang gelombang b nm

dPa – b: Selisih panjang gelombang a dan b

Nilai total AUC ditentukan dengan menambahkan semua hasil nilai AUC pada setiap interval 1 nm panjang gelombang. Nilai SPF pada tiap konsentrasi dihitung dengan menggunakan persamaan 6.

$$\text{Log SPF} = \frac{AUC}{\lambda_n - \lambda_1} \dots \dots \dots \text{persamaan 6}$$

(Rauf dkk., 2017)

Keterangan :

AUC : Area di bawah kurva

λ_n : Serapan pada panjang gelombang terbesar (400 nm)

λ_1 : Serapan pada panjang gelombang terkecil (290 nm)

Nilai SPF logartimik dihitung dengan membagi total area di bawah kurva (AUC) menggunakan perbedaan antara lamda maksimal dan minimal. Hasil nilai SPF dikategorikan pada tabel 3.

10.3 Penentuan nilai SPF UV B. Hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak dan fraksi dilakukan perhitungan nilai SPF dengan menghitung luas area di bawah kurva serapan (AUC). Spektrum serapan dengan panjang gelombang 320-290 nm dan interval 1 nm diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Perhitungan nilai AUC dapat dilihat pada persamaan 3. Nilai total AUC ditentukan dengan menambahkan semua hasil total AUC pada setiap interval 1 nm. Nilai SPF pada tiap konsentrasi dihitung dengan menggunakan persamaan 6.

10.4 Penentuan nilai SPF UV A. Hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak dan fraksi dilakukan perhitungan nilai SPF dengan menghitung luas area di bawah kurva serapan (AUC). Spektrum serapan dengan panjang gelombang 400-320 nm dan interval 1 nm diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Perhitungan nilai AUC dapat dilihat pada persamaan 3. Nilai total AUC ditentukan dengan menambahkan semua hasil nilai AUC pada setiap interval 1 nm. Nilai SPF pada tiap konsentrasi dihitung dengan menggunakan persamaan 6.

E. Skema Jalanya Penelitian

